

Title	実験的脳低酸素血症及び梗塞の組織化学的研究
Author(s)	鈴木, 敬
Citation	日本外科宝函 (1964), 33(2): 361-376
Issue Date	1964-03-01
URL	http://hdl.handle.net/2433/205705
Right	
Type	Departmental Bulletin Paper
Textversion	publisher

実験的脳低酸素血症及び梗塞の組織化学的研究

京都大学医学部外科学教室第一講座（指導 荒木千里教授）

鈴 木 徹

〔原稿受付 昭和39年1月9日〕

Histochemical Studies on Experimentally Induced Hypoxia and Infarction in the Brain

by

TAKASHI SUZUKI

From the First Surgical Division Kyoto University Medical School

(Director : Prof. Dr. CHISATO ARAKI)

Using adult cats, following three groups of anoxic encephalopathies were induced :

- 1) the permanent occlusion of the left middle cerebral artery with clipping (56 cats),
- 2) the ligation of both carotid and vertebral arteries (21 cats) and
- 3) the repeated inhalations of nitrogen gas (8 cats).

The second group was divided into three subgroups. a) Cerebral blood flow was recovered immediately after 4-10 minutes ligations of bilateral carotid and vertebral arteries (10 cats). b) Following the permanent ligations of bilateral vertebral arteries, bilateral carotid arteries were temporarily occluded for 4-10 minutes (4 cats). c) Following the permanent ligations of bilateral vertebral arteries and left carotid artery, right carotid artery was temporarily occluded for 4-10 minutes (7 cats). On a few cats of the third group, polarographic measurements of cerebral oxygen tension were made during the course of nitrogen inhalation.

Following the above-mentioned procedures, the animals of the first group were sacrificed at various intervals (immediately, 2, 4, 6, 12, 24, 30 and 48 hours, 3, 5, 7, 10 and 14 days after) and those of the second and third groups were killed 24-72 hours later.

The specimens were resected from the gray matter of the cerebrum (groups I and III) and cerebellum (groups II and III), and were immersed in the fixatives. They were cut in a cryostat as frozen sections at 15-20 μ thickness and immediately incubated in substrates as well as in control media.

Enzymes histochemically observed were acid phosphatase, alkaline phosphatase, succinic dehydrogenase, DPN-diaphorase and TPN-diaphorase. The histochemical localization of the enzyme activity was demonstrated by Gomori's lead method for acid phosphatase, Gomori's Ca-Co method for alkaline phosphatase and method using tetrazolium salts (Nitro BT) for succinic dehydrogenase, DPN-diaphorase and TPN-diaphorase.

Acid phosphatase activity was more sensitive to hypoxia than oxidative enzyme activity. This finding was equally noticed in both stagnant anoxia (groups I and II) and anoxic anoxia (groups III).

The phagocytes in the area of cerebral infarction revealed the marked acid phosphatase and oxidative enzyme activity which seemed to be parallel to phagocytic activity. Fat granule cells demonstrated such enzyme activities only slightly.

The decrease in the oxidative enzyme activity seemed to occur faster in the neuropile than in cell bodies. Nerve cells were not always more sensitive to anoxia than glia cells in this histochemical observation.

結 言

脳低酸素血症に関する実験的研究は Gildea と Cobb, Kabat と Dennis を初め諸学者により検索されてきた。最近では Weinberger らが猫の肺動脈結紮により、又 Grenell は犬の頸を pressure cuff で圧して、夫々頭部血流遮断を企て其の際生ずる脳細胞変性について研究し、又 Hicks はラッテを用い sodium cyanide 腹腔内注入、insulin 結晶腹腔内注入、窒素ガス吸入等の操作による脳低酸素血症を観察した。又 Levine はラッテの一侧総頸動脈結紮後、笑気及び窒素ガスを吸入せしめる所謂 ischemic-anoxic の低酸素血症を作成観察した。一方 Globus ら、Harvey と Rasmussen、Hain ら、Meyer、加瀬ら、半田、等は直接に前、中、後大脳動脈等に単独或いは同時結紮を加えて生ずる実験的脳変性につき、脳軟化或いは脳出血の見地より病理組織学的検索を加えた。

これら一連の脳低酸素血症の病態把握のため、各方面より多角的研究がなされてきたが、近時酵素組織化学の発展と共に、従来の形態学的知見に加うるに物質代謝面からの機能的接近が注目され初め、1961年 Becker と Barron が前記 Levine 法によるラッテ脳の酸性フォスファターゼ、ジアフォラーゼの活性変化を観察したのを初めとし、脳腫瘍、脳浮腫、培養脳細胞等に関する組織化学的検討が行なわれつつある。私は成猫を用い、①脳部分血流の永久的遮断、②全脳血流の一時的遮断、③窒素ガス吸入の3種類の実験的脳低酸素血症を作成し、大脳及び小脳皮質を対象として主として酵素組織化学的分野よりの検索を試みた。

第1章 実験動物及び実験方法

本実験にはすべて体重3～5kgの強壯な雄又は雌の成猫を使用した。

I. 実験 I 左中大脳動脈永久結紮群

成猫56匹を nembutal 麻酔の下に左側頭部に弓状切開を加え、 $1.5 \times 1.5\text{cm}$ の広さに開頭を行ない硬膜切開後、側頭葉の可及的底部にて左中大脳動脈の主枝に2個～3個の銀クリップをかけ一次的に皮膚を閉鎖した。術後抗生物質投与、補液を行なった。

以上の操作後、動物は、術直後、2, 4, 6, 12, 24, 30, 48時間後、3, 5, 7, 10, 14日後に各々生存例1～4匹を再開頭し、左 gyrus ectosylvius を検索部に選び、同時に健側の同部を対照に用いて、後述の如き肉眼的、組織学的、および組織化学的観察を行なった。尚術後24匹は死亡し実際実験に供し得たのは32匹であつた。又血流遮断時の神経学的症候は全例に見られなかつた。

〔II〕 実験 II 両総頸、椎骨動脈結紮群

成猫21匹を用い nembutal 麻酔下に頸部正中切開5cmを加え、両側総頸動脈及び両側椎骨動脈を露出しこの4動脈に対し種々の組合せにて、永久的或いは一過性血流遮断を行なった。

実験は次の各群に分けた。

A群：4動脈同時に4～10分血流遮断後、血流回復せる群—10匹

B群：両椎骨動脈を永久結紮後、直ちに両総頸動脈を4～10分一時的血流遮断せる群—4匹

C群：両椎骨動脈及び左総頸動脈を永久結紮後、直ちに右総頸動脈を4～10分一時的血流遮断せる群—7匹

4血管を遮断すると多くの猫は間もなく全身硬直と共に無呼吸となり、時に全身痙攣、尿失禁を伴う。無呼吸と同時に用手的に人工呼吸を行ない全身状態をみて4～8分後、各血管を種々の組合せにて血流を回復させた。

以上の操作後、動物を24～72時間生かした後、脱血させながら後頭下開頭し、左小脳半球を剔除し、組織化学的検索に用いた。同時に実験猫とは別に体重のほぼ等しい無処置猫の左小脳半球を剔除し、其都度対照

として使用した。尚飼育中にA群10匹中3匹、B群4匹中1匹、C群7匹中5匹は死亡した。

(III) 実験 III 窒素ガス吸入実験群

成猫8匹を nembutal 麻酔下に気管切開を行なつて T カニューレの1端を挿入、残りの2端中1端を呼吸用に、1端を吸気用に用い、中が陽圧にならない程度に純窒素ガスを充滿せしめた大ゴム風船を吸気端と連結し弁装置をつけて窒素ガスを吸入させた。又同時にポーログラフ法による脳組織酸素圧を測定するべく、下記各群1匹ずつを選んで左側頭部を開窓して硬膜を切開し、左中大脳動脈支配流域の脳表面に電極が密着する様固定し、窒素ガス吸入実験中連続的に酸素圧を測定した。

尚ポーログラフ装置は、加電圧装置及び記録計として島津製作の直記式 Oxygraph OX-II 型を、電極は Clark のポーログラフ電極を用い、 $-0.6V$ の連続加電圧法によつた。

窒素ガス吸入後間もなく動物の呼吸は速く大きな

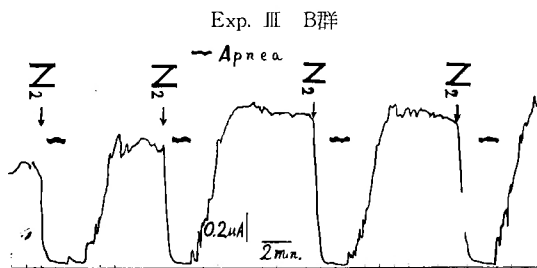
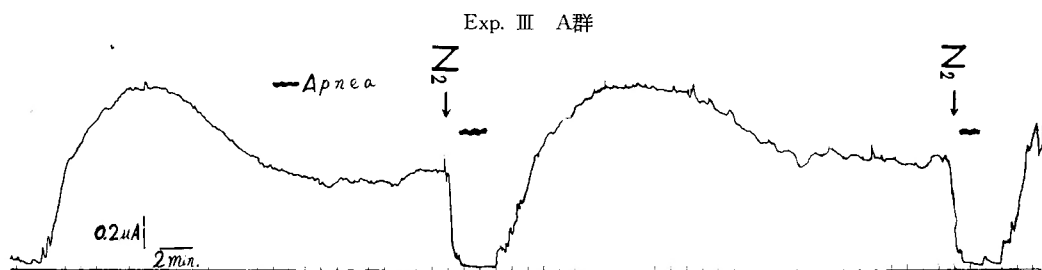
いは回復途上にあるものに更に同様の吸入操作を反覆した。即ち窒素ガス吸入侵襲の間隔及び回数により次の2群に分けた。

A群：無呼吸から充分回復後、次のガス吸入侵襲を加え(約30分間隔)これを数回反覆せる群—3匹。

B群：無呼吸からの回復途上、即ち症候学的には、無呼吸から回復した呼吸が規則的になり初め、瞳孔光反射も回復した頃、次のガス吸入侵襲を加え(約5～10分間隔)、これを数回ないし10数回反覆せる群—5匹。

この様な二種の侵襲方式のポーログラフ曲線は図に示す如くである。

以上の操作後24～72時間で、脱血させながら開頭し、右大脳皮質及び右小脳半球皮質を剔除し組織化学的検索に用いた。同時に実験猫とは別に体重のほぼ等しい無処置猫の右大脳皮質及び右小脳半球皮質を同時に剔除し、其の都度対照とした。尚A群は全例生存したが、B群は5匹中2匹が飼育中に死亡した。



り、やがて努力性、次に次第に浅く遅くなり、四肢硬直、痙攣、尿失禁等を伴つて吸入開始後30秒～3分で1～2分間の無呼吸期に入る。この時期に窒素ガスを切つて空氣に切り換えておき、其後間もなく起こる間歇的自発呼吸あるいは人工呼吸により状態を回復させた。そして以下述べる如く完全に回復した後、ある

第2章 実験成績

(I) 実験 I 左中大脳動脈永久結紮群

1) 肉眼的所見

術後昏睡持続死亡せる例を除き、4～6時間頃から昏睡から醒め初めるが、可成り多くの症例において、

種々の程度の片麻痺（特に前肢）を呈し、2日目頃迄歩行、摂食共に不能であるが、以後、これらの症状は漸次軽快し初め、1週間目頃からは片麻痺も回復、歩行時の病巣側への回転運動も軽快し、自発的に食事摂取も可能となる。これらの諸神経症状はおおむね病巣の大きさと平行する様に思われた。

各時間後に於ける大脳皮質病巣発生部位は、左中大脳動脈支配流域に限られていたが、大きさはまちまちで側頭葉から頭頂葉に至るものから、全然肉眼的変化の見当らぬもの迄いろいろである。大脳皮質表面所見に何ら肉眼的変化の見られなかつたのは、32匹中10匹であつた。その肉眼的変化の時間的推移は症例により勿論多少の遅延があるが、大体以下述べる様なものが多かつた。即ち結紮後2時間目頃より病巣皮質表面は充血化或いは蒼白化し初め、12時間目頃から稍軟化の兆しがみえ出し、これは時と共に顕著となり、48時間目頃には病巣は粥状となり、5日目頃から泥状化し、10日目頃には病巣は境界が鮮明になる傾向を帯び初めた。組織学的に出血巣を認めたものは可成りあつたが、肉眼的に著明な出血病巣を認めたものは2例のみであつた。

2) 組織学的所見

用いた染色法は、10%ホルマリン固定パラフィン切片によるヘマトキシリン・エオジン染色、アルコール固定ツエロイジン切片によるニッスル染色、10%ホルマリン固定パラフィン切片による Feulgen 反応、10%ホルマリン固定パラフィン切片、及び10%ホルマリン固定凍結切片によるPAS染色、10%ホルマリン固定凍結切片によるズダンIV、ズダン黒染色、ホルモールカルシウム固定による Baker の酸性ヘマチン法等である。

以下これらの時間的変化について記述する。

4～6時間後で、すでに拡大せる毛細管の周囲に白血球の遊出を認めた例がある。しかしその様な例でも神経細胞や膠細胞の変化は全くみられない。

12時間後のものも、血管の変化がみられるものがあるが、矢張り神経細胞、膠細胞の退行性変化は余り著明ではない。又、反応性細胞の浸潤も殆んど認められなかつた。

24時間後のものでは出血巣が認められるものもあつた。神経細胞では或程度の退行性変化がみられ、更に軽度の gliosis、血管周囲の細胞浸潤が認められる。又 Feulgen 反応で神経細胞の核に軽い pycnosis が認められる。

48時間～3日後になると、基質の微細構造が不鮮明となり、一部ではporousなところもあり、症例により出血巣の混在するものもあり、梗塞部と正常部との境界が可成り鮮明となる。神経細胞は、硬化したもの、chromatolysisを思ふもの、ghost cell等があり、Feulgen 反応で、神経細胞核は pycnosis の程度の強いものや、karyolysis、karyorrhexis化したもの等が見受けられる。貪食細胞が多数出現しており、マクログリアの増殖も多少認められる。

5～7日後では、基質はporousで貪食細胞が多数出現し、増殖せるミクログリア、アストログリアが混在している。又貪食細胞中には、僅かにズダン好性を認めるものがあり、又 Baker の酸ヘマチン法で青染されるものも混在している。血管壁や増殖した反応性細胞にPAS陽性のものがある。

10～14日後になると、出血巣、軟化巣及び血管周囲には、ズダン染色にて強陽性を示す脂肪顆粒細胞が多数認められ、又病巣周辺部にはアストログリアの増生が認められた。又無構造の壊死組織が多数みられる。PAS及び Baker の酸ヘマチン法所見は前回と同様である。

3) 酵素組織化学的所見

— 検索せる酵素は、酸性フォスファターゼ、アルカリ性フォスファターゼ、コハク酸脱水素酵素、DPN ディアフォラーゼ、TPN ディアフォラーゼの5種類である。

動物を生きた儘開頭、患側及び健側（対照）皮質表面より、 $6 \times 6 \times 6$ mmの組織片を切り出し、一部4℃の冷フォルモールカルシウム液に、一部は4℃の冷アセトン中にて約30分固定後、アセトン・ドライアイス冷凍器内にて迅速に凍結し、 $-14^{\circ}\text{C} \sim -20^{\circ}\text{C}$ のクリオスタット中にて $15 \sim 20 \mu$ の凍結切片を作成、後述する方法により、酸性フォスファターゼ、アルカリ性フォスファターゼ、DPN ディアフォラーゼ、TPN ディアフォラーゼの染色に当てた。又、冷アセトン固定片は更に4℃ phosphate buffer中に約30分間浸し、以後同様の操作にて切片作成後、コハク酸脱水素酵素染色に当てた。

染色法として酸性フォスファターゼは Gomori の鉛法、アルカリ性フォスファターゼは Gomori の Ca-Co 法、コハク酸脱水素酵素は tetrazolium 塩 (Nitro BT) を用いる方法、DPN、及び TPN ディアフォラーゼも tetrazolium 塩 (Nitro BT) を用いる方法によつた。

尚、以上の染色は非酵素的反応に対する吟味は十分

に行ない、又全例に亘り同一脳の反対同一野よりの組織片を対照として同時に染めた。

④ 酸性フォスファターゼ (ACPと略)

正常猫大脳皮質における ACP の分布は、神経細胞に多量存在し、 $0.3\sim 0.7\mu$ に亘る硫化鉛の黄褐色顆粒として原形質内におおむね一様の分布を以て呈示される。又時として小血管壁にもみられた。これら ACP 陽性顆粒は、肝細胞におけると同様、神経組織に於いても、リゾソーム (lysosome) なる細胞質内小器官を示すものとして取扱う傾向にある。(後述)

さて、ACP 活性は陽性顆粒の数、大いさ、分布形式の点において、血流遮断後 6 時間目のものより変化を認めた。即ち一部の陽性顆粒は粗大となり、或るものでは輪廓が破壊され、分布も一様でなくなるが、12 時間目頃より陽性顆粒の数が減少し初めると共に、顆粒 1 ヲ 1 ヲの持つ酵素活性も減弱し初める。しかし最後迄顆粒としての形態を維持した儘減弱していくものが多い。これら退行性変化は漸次時と共に顕著となり、24 時間後には病巣部活性は殆んど減弱消失するものもある。しかし病巣周辺部にては顆粒形態をとつた儘減弱せる活性を呈示するものの中に、原形質内の顆粒形態は全く破壊されているが正常以上に強い活性を示すものが混在している事がある。これらの型の相違が侵襲を受けた神経細胞の予後を暗示するものかどうかは不明である。

病巣部の神経細胞内 ACP 活性は以後全く消失してしまうが、3 日目頃より、著明に増加した一連の貪食細胞に著明な活性が認められる。即ち組織球、ミクログリア、血中貪食細胞等がそれで、これら細胞は摂取貪食前には正常神経細胞以上の強度の活性を胞体に均質に呈示しているが、漸次壊死物質を貪食するにつれて細胞自体円形膨化すると共に陽性顆粒分布は不規則となり活性も低下し初め、遂に脂肪顆粒細胞と化すに及び活性は全く減弱、または消失するに至る。即ち貪食細胞の ACP 活性はその細胞の持てる貪食能力に関係する様である。これらの所見は 14 日目に至る迄同様にみられた。

⑤ アルカリ性フォスファターゼ (ALPと略)

基質液 pH を $9.0\sim 9.5$ に調整して検出すると、本酵素は脳毛細管壁に陽性に呈示され、脳軟膜、時として神経細胞の細胞膜及びゴルジ装置にも陽性に出るといわれるが、神経細胞は活性の出方が必ずしも規則的でなかつたので本実験にては専ら血管壁の活性を中心として検索した。

ALP は本実験中最も早く変化を示した酵素で、血液遮断後 4 時間目より毛細管壁の活性は増強を示すものがあり、6 時間後に至り更に強まるが、12 時間後より減弱し初め、以下 24 時間、48 時間と減弱の一途をたどる。又 5 日以後において中血管壁に弱陽性の活性を示すものがあつた。又 反応性細胞についてはその細胞膜に極めて弱い活性を時として現わすのみである。

⑥ DPNディアフォラーゼ (DPN-Dと略)

成猫正常大脳皮質における DPN-D 活性は灰白質に青色フォルマザンの微細顆粒として示される。陽性顆粒は神経細胞、膠細胞、血管系、neuropile のいづれにも一面にみられ、特に巨大錐体細胞の細胞質により強度に染められる傾向があつた。これらの活性はミトコンドリア及び小胞体 (endoplasmic reticulum) に一致して存在するといわれている。

本酵素の変化は血流遮断後 12 時間で現われるものがあつた。先づ neuropile の活性の減弱が目立ち初め、この傾向は 24 時間、30 時間と時を経るに従い次第に顕著となり、その結果血管、神経細胞、膠細胞の活性が相対的によく残存する。又出血巣には全く活性は認められず壊死軟化巣内では、30 時間後には neuropile はもとより血管の活性もなくなり、神経細胞と膠細胞が減弱せる活性を呈示しているが、これとても 48 時間以後には消失するに至る。

細胞単位に観察した場合、これら陽性顆粒は数を減ずると同時に、分布状態の一様性が多少乱れてくる様であるが、ACP 陽性顆粒にみられた如く顆粒の粗大、破壊等はそれ程著明に見当らなかつた。

3 日以後に増加してくる反応性細胞については ACP におけると同様貪食細胞は最強度の活性を保持し、それが遊走貪食するにつれて活性は低下し初め、脂肪顆粒細胞となるに及び殆んど減弱し泡沫化するに至る。又壊死が顕著となる 3 日以後において、組織球産出に関係ありと思われる血管壁の活性が極めて増強し、又軟脳膜よりの線維芽細胞、病巣周辺の反応性アストログリアにも中等度の活性が示された。

軟化巣辺縁の組織にては、神経細胞、膠細胞によく活性が保持されていた。

⑦ TPNディアフォラーゼ (TPN-Dと略)

本酵素もフォルマザン顆粒として正常猫大脳灰白質一面に赤灰色に染め出されるが、DPN-D 程、神経細胞が濃染しない。この陽性顆粒は主としミトコンドリアに一致して局在するといわれている。

実験 I

時間	猫 No.	SDH	ACP	DPN-D	TPN-D	ALP
直後	* 118	+	+	+	+	+
2 時間	147	+	+	+		+
4 時間	145	+	+	+		+
	117	+	+	+		+
	* 116					
6 時間	144	+	±	+		+
	148	+	±	+		+
	* 104					
12 時間	143	±	±	±		±
	159	±	±	±		±
	* 124					
24 時間	102	+	±			
	125	±	±	±		
	146	±	—	±	±	±
	* 110					
30 時間	142	—	±	±		
	160	±	—	±		±
	* 106					
48 時間	119	±	±			
	151	±	—	±		±
	158	—	—	—		±
	* 121					
3 日	135	±	±	±		
	151	(+)—	(+)—	(+)—	(+)—	±
	* 111					
	* 123					
5 日	122	(+)—	(+)—	(+)—		
	137	(+)—	(+)—	(+)—		±
	* 130					
7 日	136	(+)—	(+)—	(+)—		±
10 日	141	(+)—	(+)—	(+)—	(+)—	±
14 日	150	(+)—	(+)—	(+)—	(+)—	±

++ 増強 + 正常 ± 軽度減弱
— 強度減弱 — 消滅
() 内は反応性細胞の酵素活性
* は肉眼的にも、組織化学的にも変化のみられなかつた例

実験的にみた本酵素活性の消長及び反応性諸細胞に対する態度はおおむね DPN-D と同じであり、前述し

た所見以外特筆すべき事はなかつた。

④ コハク酸脱水素酵素 (SDH と略)

猫大脳皮質における SDH 活性は、ディアフォラーゼ同様灰白質にみられ、青色のフォルマザン顆粒として示される。陽性顆粒は神経細胞、膠細胞、neuropile のいづれにもみられ、それら細胞のミトコンドリアに一致して活性を示すといわれるが、特に巨大錐体細胞の細胞質に強い活性を示した。

実験的にみた SDH 活性の動向は、おおむね前述せるディアフォラーゼと平行する。即ち 12 時間後より neuropile における減弱が目立ち初め、24 時間、30 時間後に至り neuropile の活性は殆んど消失するが、神経細胞、膠細胞は減弱しながらも尚活性を保持している。この時細胞質内陽性顆粒は稍粗大となるものもある。

又諸種反応性細胞に高度の活性を示す点もディアフォラーゼと同様で、特に貪食細胞については、貪食膨満するに従つて顆粒は不規則となり、更に細胞質は泡沫状となり、脂肪顆粒細胞となると活性は減衰する。又病巣の周辺組織における活性は最後までよく保持されているが、その侵され方は病巣内初期像と同様、細胞成分に、より多く保持されていた。

〔II〕 実験 II 両総頸、椎骨動脈結紮群

1) 肉 眼 的 所 見

侵襲後昏睡持続して死亡せる例を除き、A 群、B 群共に、血流遮断による病巣に基因すると思われる神経学的症状は認められず、又開頭時肉眼的に著変も見出せなかつた。C 群は生存例全例、起立歩行、摂食共に不能で、開頭時、脳浮腫が認められたが、小脳皮質表面には、出血巣、軟化巣等は認められなかつた。

実験 II

	実験数	生存数	死亡数	ACP	SDH	HE. Nissl.
対照群	12			+	+	正 常
A 群	10	7	3	+	+	正 常
B 群	4	3	1	+	+	正 常
C 群	7	2	5	±	±	軽度変性
計	21	12	9			

A 群：4 動脈一過性遮断
B 群：両椎骨動脈永久結紮
両総頸動脈一過性遮断
C 群：両椎骨動脈、左総頸動脈永久結紮
右総頸動脈一過性遮断

2) 組織化学的所見

前実験と同一方法により、酸性フォスファターゼ及

びコハク酸脱水素酵素を検索し、更にヘマトキシリン・エオジン染色、ニッスル染色、及び Feulgen 反応を併用した。

A 群については、酵素組織化学的にも組織学的にも何ら変化を見出せなかつた。

B 群についても、酵素組織化学的にも組織学的にも全例著変は認めなかつた。

C 群については、生存例全例に次の如き変化を認めた。

① 酸性フォスファターゼ (ACP と略)

成猫正常小脳における ACP 活性はプルキンエ細胞に最も強度に呈示されるので、本実験にては専らプルキンエ細胞を対象に選んだ。同細胞内の ACP 陽性顆粒は細胞質内に重なりあつて多量存在し、時にその分布状態及び顆粒の大いさは多少の変動がみられる事もある。

実験群中 C 群にて、これら陽性顆粒の数は減少し、分布はまばらとなり、活性の減弱した細胞が、プルキンエ細胞層内に多数みられた。

② コハク酸脱水素酵素 (SDH と略)

成猫小脳皮質における本酵素はプルキンエ細胞層に最も著明な活性を示し、次に顆粒層、分子層の順に弱く、白質は殆んど活性を呈示しない。

実験群中 C 群にて、プルキンエ細胞の細胞質一面に顕示された活性は、全体として減弱し、又顆粒層にても neuropile の活性の減弱が比較的顕著にみられた。

③ 其 他 の 所 見

ヘマトキシリン・エオジン染色並びにニッスル染色では著変を認めなかつたが、唯ニッスル染色で、一部のプルキンエ細胞に軽度の退行性変化と思われる所見が窺われた。

Feulgen 反応では認むべき変化はみられなかつた。

〔III〕 実験 III 窒素ガス吸入実験群

1) 肉 眼 的 所 見

ガス吸入侵襲及び麻酔による昏睡よりの覚醒後、A 群は全例、歩行、摂食共に正常と変りなく、1 例のみ性格変化 (易怒性、狂暴化) を来したものがあつたが、他に神経学的著変は認められず、又 B 群生存例 3 例中 2 例に、失調性歩行を呈するものがあつたが、開頭時に軽度の脳浮腫を認めるのみで、脳皮質面には、出血巣、軟化巣等は見出せなかつた。

2) 組織化学的所見

前実験と同一方法により、酸性フォスファターゼ、コハク酸脱水素酵素、DPN ディアフォラーゼ、TPN

ディアフォラーゼを検索し、同時にヘマトキシリン・エオジン染色を併用した。

A 群については、大脳、小脳共に異常組織所見は全例認められなかつた。

B 群は生存例 3 例中 2 例に、ACP にのみ変化所見を得た。即ち大脳、小脳共に神経細胞内 ACP 陽性顆粒の数は減少し、分布もまばらとなり、時に顆粒の粗大を認めるものもある。又大脳にて殆んど活性の消失した神経細胞も見られた。これらの変化は、ガス吸入回数が多いもの程、著明に思われる。

一方、SDH、DPN-D、TPN-D 等の酸化酵素群は大脳、小脳共に認むべき変化は見出せなかつた。

又、ヘマトキシリン・エオジン染色では、全例著明な変化が認められない。

第 3 章 考 案

Fulton の分類によれば私の行つた実験 I 及び II 群は、stagnant anoxia に、実験 III 群は anoxic anoxia に属するものであつて、前者においては、血流遮断という手段により、血中酸素量の低下の他に、グルコース其他の栄養物の補給障害、老廃産物の蓄積等が加味されている点において、脳血流量に著変はないが、血中酸素分圧低下著しい第 III 群とは意義を異にしている。

1955 年 de Duve はラッテ肝ホモジェネートより ACP を初め各種加水分解酵素を含むリゾソーム分画を初めて発見し、更に Novikoff らは同分画を電顕で検索し single outer membrane により特徴づけられる electron dense bodies を肝リゾソームの本態とした。其の後各組織でもリゾソームと推定される顆粒が見出され、神経組織にみられる ACP 陽性顆粒もリゾソームの代表的指標と考えられている。最近小川らは電顕を用いて組織化学的に正常ラッテ空腸及び小脳の ACP 微細局在を観察し、特に小脳ではプルキンエ細胞及び顆粒細胞のリゾソーム及びゴルジ装置の滑面膜に ACP 活性の局在するをみた。そして更に細胞内代謝における ACP の機能を digestion, secretion 或いは excretion, pigment formation に分類し、本質的には細胞の segregating mechanism に関与すると述べている。リゾソーム腫大—これを cytolysome と呼ぶが—は閉鎖卵胞、角化扁平上皮、胆管結紮後のラッテ肝、移植可能な腫瘍、尿管結紮後のラッテ腎、低酸素血症時のラッテ脳、チフテリア毒注入時のラッテ脳等々の生理的、病的条件下の退行性細胞にて報告されており、又 Becker は cytolysome を脳神経細胞障害の最も敏感な指標とし同時にミ

トコンドリア内酵素の変化に先んずる事を主張した。我々の結果では彼等の述べた程明瞭ではなかったが、実験Ⅰ及びⅢ群にて、脱水素酵素やディアフォラーゼ等の酸化酵素の変化はもとより、他の種々の組織学的検索にて余り変化の見出せなかつた時期に、既にACP顆粒の粗大、減少等が時として認められた。又教室牧田は猫を用いての実験的頭部外傷による神経細胞の変化を電顕で追求しミトコンドリアの変化以前にリゾソームと思われるdense bodyの変化を認め、又このdense bodyが大形となり数個融合する過程につき述べている。de Duveも蛋白分解酵素、レシチナーゼ、低酸素血症等の作用でリゾソームの膜が破れるとリゾソーム内酵素群がreleaseされると述べ、このlysosome ruptureの機転につき更に言及している。

さて、実験Ⅰ群にて梗塞巣に出現した貪食細胞に極めて著明なACP活性が顕われ、特に摂取貪食前、もしくは活動初期の貪食細胞程活性が強く、貪食により漸次膨満し遂に脂肪顆粒細胞と化すに及び活性は減弱化する事実は、これらACP陽性顆粒の活性度が、その細胞のもつ貪食力を呈示している如く思われる。マクロファージ型の細胞がACP活性を有する事は古くより知られ、最近ではBarkaは動物の肝及び網内系にanoxic change及び急性ethionin中毒下で著明なACP陽性のglobuleの現われるを知り、加えてkupfer cell、マクロファージ、脾、淋巴節、胸腺等の網内系細胞のACP活性はこれら網内系活動量のparameterであると推定した。PavillardとRowleyもマクロファージのACP活性はbactericidal powerよりもphagocytic abilityに比例する事を実験的に証明し、ThorbeckeらもBCG腹腔内注入マウスの腹水中マクロファージは正常マウスからのマクロファージ以上のACP活性をみた。

ALPについては、Landowらが初めて脳毛細管に多量の本酵素を認め、恐らくグルコースが血管内より組織中に通過する際に役割を演ずるのであろうと考え、又WinslockiとDempseyは本酵素が血液脳関門に関係し血管から実質内に侵入する嚙含有物質を制御し、又毒物侵入を防ぐと推定した。恩村は肝性昏睡(犬及びマウス)、尿毒症(犬及び家兎)、脳膜炎(家兎)等の実験的脳圧亢進時にて脳の代謝異常、形態学的著変の見出されない以前に既にALPが強い減弱を示すのをみた。又篠永らもバルーン法により作成した猫の実験的脳浮腫時に、脳毛細管のALP活性の低下を認めている。又電顕を用いてALPの微細所在を調べたMölbertyらやClarkは、活性が細胞膜に一致して存する事を観

察しており、これらの諸所見よりALPは細胞に出入する物質の透過、吸収、分泌、排泄等に関係していると思われるが、これは吸収、分泌に関係ありといわれるゴルギ装置にALPが陽性に出るといふ諸報告を参照にする時一層興味深い。

実験Ⅰ群にて血流遮断後4～6時間にかけてのALP活性の一時的増強の理由は分らないが、ヘマトキシリン-エオジン染色で著しい毛細管の拡大がみられるので充血又は鬱血に関係のある変化かもしれない、あるいは血流異常による毛細管透過性に対する代償機転かもしれない。しかし梗塞部では12時間以後では活性の減弱がみられた。ただACPや酸化酵素で著明な増強をみた反応性諸細胞には殆んど活性を示さなかつた。Thorbeckeらのマウス肝網内系誘発実験にても、ALP、ACP共に増強を示したが、sinusoidの内皮辺縁に所在するALP活性は、Kupfer cell所在のACP活性よりも早期に増強を示した。

酸化酵素として本実験に用いた酵素は、SDH、DPN-D、TPN-Dの3種類である。SeligmanとRutenbergが1951年テトラゾリウム塩を用いてSDHの検出を行なったのが初めてであるが、本実験にては水素受容体としてのテトラゾリウム塩にはnitrobluetetrazoliumを使用し、中間体としてMenadion(V.K₃)を添加した。私の行なった全実験を通じこれら各酸化酵素は、ほぼ同様の消長を示した。即ち低酸素血症下では、ACP程活性の変動は鋭敏ではなく、神経細胞や膠細胞の活性は予想以上に長く残存した。しかも従来いわれていた如く神経細胞の方が膠細胞より早く侵されるという所見は必ずしも得られなかつた。

実験Ⅰ群にて梗塞巣内に多数出現する貪食細胞、反応性膠細胞、線維芽細胞等の反応性細胞に著明な酸化酵素活性の増強もみたが、これら諸細胞のミトコンドリア内にて行なわれる盛んな酸化代謝過程を窺い知るに十分であるが、特に貪食細胞において、摂取貪食前胞体に均質に示された強度の活性が、摂取膨満するにつれて不規則顆粒状となり脂肪顆粒細胞となるに及び活性は殆んど減弱する所見は酸化酵素すべてに共通にみられる様であつて、ACPと同様、活性が貪食能力を示唆するものの如くである。Friedeも、人脳病理組織より得た反応性アストログリアに著明な酸化酵素活性の上昇をみ、又Luseは電顕により正常アストログリアに比べ、反応性アストログリアはミトコンドリアに富む事を述べている。

前述した如く、私の行つた一連の低酸素血症実験の

脳組織に対する侵襲機序は各々異なるのであるが、細胞変性度に差こそあれ、その変化形式は組織化学的に殆んど有意の差を認めなかつた事は興味深い事実である。

第4章 結 語

1. 成猫を用い、1), 左中大脳動脈永久結紮, 2), 両総頸, 両椎骨動脈結紮, 3), 窒素ガス吸入の3種類の実験的脳低酸素血症を作成し、大脳, 小脳皮質に組織化学的検索を試みた。

2. 低酸素血症の際には酸化酵素は比較的よく保存され、むしろ酸性フォスファターゼの活性減弱の方が鋭敏に現われた。之は stagnant anoxia の際も anoxic anoxia の際も同様である。

3. 梗塞の場に現われる食喰細胞には、酸性フォスファターゼ、コハク酸脱水素酵素、ディアフォラーゼの何れも食喰前には活性増強し、食喰と共に活性減弱を認めた。

4. 低酸素血症により酸化酵素活性減弱の目立つた順は、neuropile, 血管、そして神経膠細胞、或いは神経細胞であつて、神経細胞の方が神経膠細胞より早く侵されるという所見は得られなかつた。

稿を終るに臨み、終始懇切な御指導及び御校閲を賜つた荒木千里教授、景山直樹講師、本学解剖学教室岡本道雄教授及び小川和助助教授に深甚の謝意を捧げます。又ホーログラフに御援助頂いた青柳実先生に御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Barka, T. : On the acid phosphatases of liver and reticuloendothelial cells. *J. Histochem. Cytochem.*, **8** : 320, 1960.
- 2) Barron, K. D. : Histochemical study of neuronal necrosis produced by intracerebral injection of diphtheria toxin. *Neurology*, **11** : 714, 1961.
- 3) Becker, N. H., and Barron, K. D. : The cytochemistry of anoxic and anoxic-ischemic encephalopathy in rats. I. Alterations in neuronal lysosomes identified by acid phosphatase activity. *Am. J. Path.*, **38** : 161, 1961.
- 4) Becker, N. H. : The cytochemistry of anoxic and anoxic-ischemic encephalopathy in rats. II. Alterations in neuronal mitochondria identified

- by diphosphopyridine and triphosphopyridine nucleotide diaphorases. *Am. J. Path.*, **38** : 587, 1961.
- 5) Burstone, M. S. : The relationship between fixation and techniques for histochemical localization of hydrolytic enzymes. *J. Histochem. Cytochem.*, **6** : 322, 1958.
- 6) Clark, S. L. : The localization of alkaline phosphatase in tissues of mice, using the electron microscope. *Am. J. Anat.*, **109** : 57, 1961.
- 7) De Duve, C. : Lysosomes, a new group of cytoplasmic particles. In "Subcellular Particles", Ronald Press, New York., 128, 1959.
- 8) De Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wittiaux, R., and Appelmans, F. : Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *Biochem. J.*, **60** : 604, 1955.
- 9) Friede, R. L. : The cytochemistry of normal and reactive astrocytes. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, **11** : 471, 1962.
- 10) Fulton, J. F. : A Textbook of Physiology. W. B. Saunders Philadelphia, 812, 1955.
- 11) Gildea, E. F., and Cobb, S. : The effects of anemia on the cerebral cortex of the cat. *Arch. Neurol. Psychiat.*, **23** : 876, 1930.
- 12) Globus, J. H., Epstein, J. A., Green, M. A., and Marks, M. : Focal cerebral hemorrhage experimentally induced. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, **8** : 113, 1949.
- 13) Grenell, R. G. : Central nervous system resistance. 1. The effect of temporary arrest of cerebral circulation for periods of two to ten minutes. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, **5** : 131, 1946.
- 14) Hain, R. F., Westhaysen, P. V., and Swank, R. L. : Hemorrhagic cerebral infarction produced by arterial occlusion. An experimental study. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, **11** : 34, 1952.
- 15) Harvey, J., and Rasmussen, T. : Occlusion of the middle cerebral artery. *Arch. Neurol. Psychiat.*, **66** : 20, 1951.
- 16) Hicks, S. P. : Brain metabolism in vivo. 1. The distribution of lesions caused by cyanide

- poisoning, insulin hypoglycemia, asphyxia in nitrogen and fluoroacetate poisoning in rats. *Arch. Path.*, **49** : 111, 1950.
- 17) 半田譲二 : (未発表)
 - 18) 石川 進 : ポーラログラフ法による脳副行循環の研究, 特にその臨床的応用を目的として, 日外宝, **30** : 303, 1961.
 - 19) Kabat, H., and Dennis, C. : Decerebration in the dog by complete temporary anemia of the brain. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **38** : 864, 1938.
 - 20) 加瀬正夫, 小野順一, 中尾君代, 古益暢夫, 冷牟田英三 実験的脳血管障害の発生過程とその観察 脳出血方面一, 最新医学 **16** : 2394, 1961.
 - 21) Landow, H., Kabat, E. A., and Newman, W. : Distribution of alkaline phosphatase in normal and neoplastic tissues of the nervous system. *Arch. Neurol. Psych.*, **48** : 518, 1942.
 - 22) Levine, S. : Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am. J. Path.*, **36** : 1, 1960.
 - 23) Luse, S. : The ultrastructure of normal and reactive astrocytes. *Lab. Invest.*, **7** : 401, 1958.
 - 24) 牧田泰正 : 実験的頭部外傷による神経細胞の変化の電子顕微鏡的研究. 日外宝, **31** : 822, 1962.
 - 25) Mandel, M. M., and Berry, R. G. : Human brain changes in cardiac arrest. *Surg. Gyn. Obst.*, **108**, 692, 1959.
 - 26) Meyer, J. S. : Importance of ischemic damage to small vessels in experimental cerebral infarction. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, **17** : 571, 1958.
 - 27) Mölbert, E. R. G., Duspiva, F., and von Deimling, O. H. : The demonstration of alkaline phosphatase in the electron microscope. *J. Biophys. Biochem. Cyt.*, **7** : 387, 1960.
 - 28) Novikoff, A. B. : Lysosomes and Related Particles. In : *The Cell*, II. Academic press, New York, 423, 1961.
 - 29) Novikoff, A. B., Beaufay, H., and de Duve, C. : Electron microscopy of lysosome-rich fractions from rat liver. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **2** : Suppl., 179, 1956.
 - 30) 小川和朗, 水野 昇, 橋本 健, 藤井園三, 岡本道雄 : 培養神経組織の細胞化学, (Ⅲ) 染色法補遺—特にLysosomeについて. 京都大学医学部解剖学第一講座論文集 **4** : 1, 1960.
 - 31) Ogawa, K., Shinonaga, Y., and Saito, Y. : Demonstration of acid phosphatase activity in the normal rat jejunum by means of electron microscopy. *Okajimas Folia Anat. Japon.*, **38**, 355, 1962.
 - 32) Ogawa, K., Shinonaga, Y., and Suzuki, T. : Electron histochemical demonstration of acid phosphatase activity in the rat cerebellum. *J. Electronmicr.*, **11** : 111, 1962.
 - 33) 恩村雄太 : 第3回組織化学会 於大阪 1962年9月28日
 - 34) Pavillaud, E. R. J., and Rowley, D. : A comparison of the phagocytic and bactericidal ability of guinea-pig alveolar and mouse peritoneal macrophages. *Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **40** : 207, 1962.
 - 35) Seligman, A. M., and Rutenberg, A. M. : The histochemical demonstration of succinic dehydrogenase. *Science*, **113** : 317, 1951.
 - 36) 妹尾左知丸, 高木康敬, 武田 進, 小川和朗 共著 : 最新細胞学, 朝倉書店, 東京, 1963.
 - 37) Shinonaga, Y., Kondo, Y., Ogawa, K., and Ishii, S. : Alkaline phosphatase activity in normal rodent brain and experimentally induced cerebral swelling. *Arch. Histol. Japon.*, **22** : 193, 1962.
 - 38) Thorbecke, G. J., Old, L. J., Benacerroff, B., and Clarke, D. A. : A histochemical study of acid, and alkaline phosphatase in mouse livers during various conditions modifying activity of the reticuloendothelial system. *J. Histochem. Cytochem.*, **9** : 392, 1961.
 - 39) 若林陽夫 : ミクロブリアの変化よりみたる実験的脳震盪. 日外宝, **30** : 736, 1961.
 - 40) Weinberger, L. M., Gibbon, M. H., and Gibbon, J. H. : Temporary arrest of the circulation to the central nervous system. II. Pathologic effects. *Arch. Neurol. Psych.*, **43** : 961, 1940.
 - 41) Winslocki, G. B., and Dempsey, E. W. : The chemical cytology of the choroid plexus and blood-brain barrier of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *J. Comp. Neurol.*, **88** : 319, 1948.

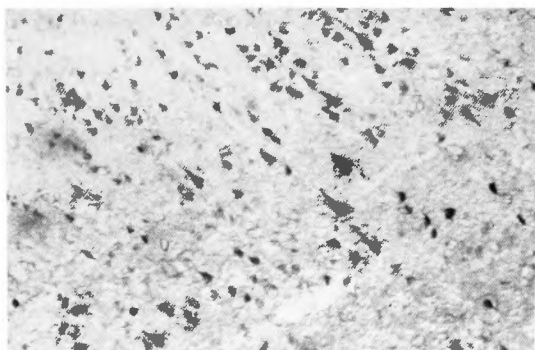


Fig. 1 正常成猫大脳皮質 (pyramidal cell layer)
ACP ($\times 100$)

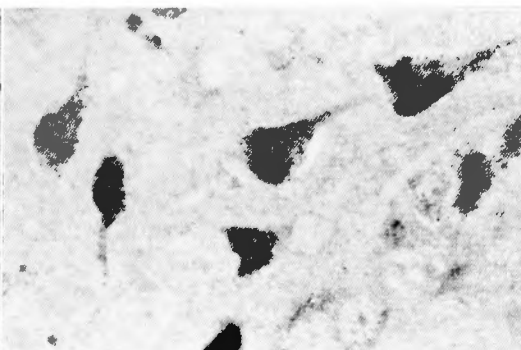


Fig. 2 正常成猫大脳皮質 (pyramidal cell layer)
ACP ($\times 400$)

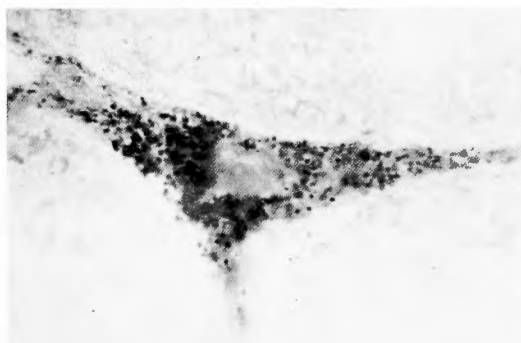


Fig. 3 正常成猫大脳皮質. 神経細胞.
ACP ($\times 1000$)

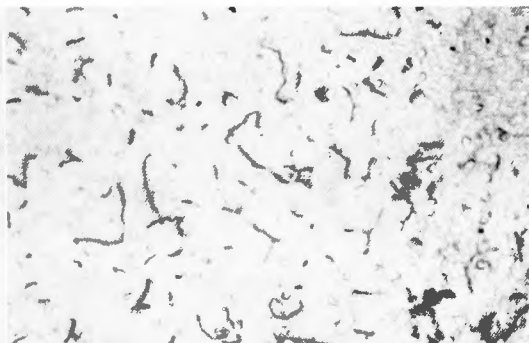


Fig. 4 正常成猫大脳皮質
ALP ($\times 100$)

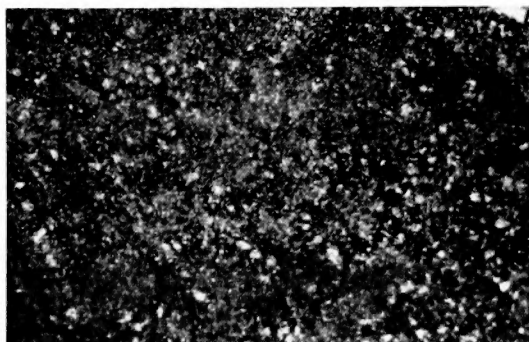


Fig. 5 正常成猫大脳皮質
DPN-D ($\times 100$)

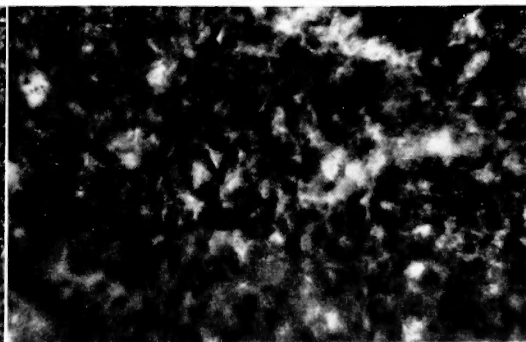


Fig. 6 正常成猫大脳皮質
SDH ($\times 400$)

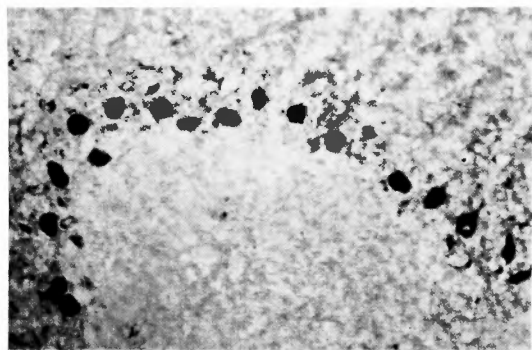


Fig. 7 正常成猫小脳
ACP (×100)

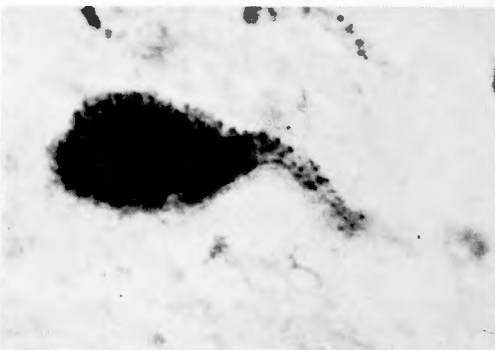


Fig. 8 正常成猫小脳, プルキンエ細胞
ACP (×800)

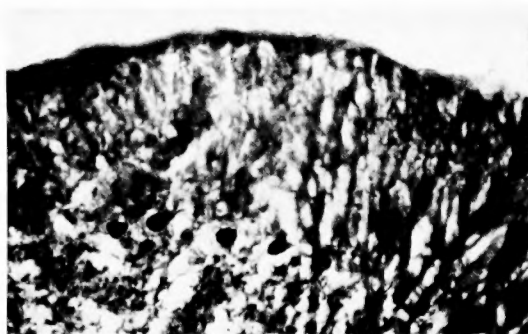


Fig. 9 正常成猫小脳皮質
SDH (×100)

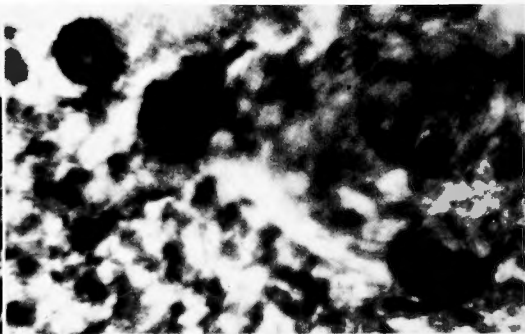


Fig. 10 正常成猫小脳皮質
SDH (×400)

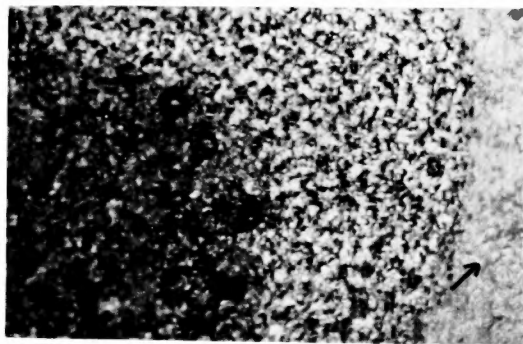


Fig. 11 正常成猫小脳
DPN-D, 右端の弱活性層は白質. (×100)



Fig. 12 Exp. I, 血流遮断6時間後の
大脳錐体細胞. ACP (×400)

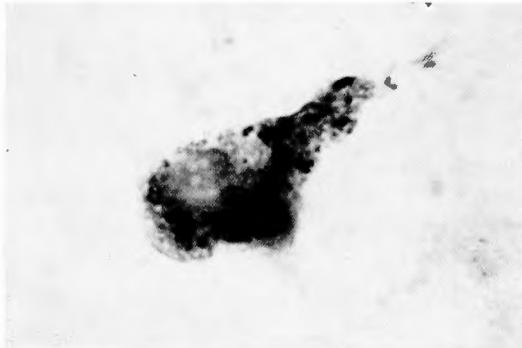


Fig. 13 Exp. I. 血流遮断 6 時間後の大脳錐体細胞
ACP ($\times 1000$)

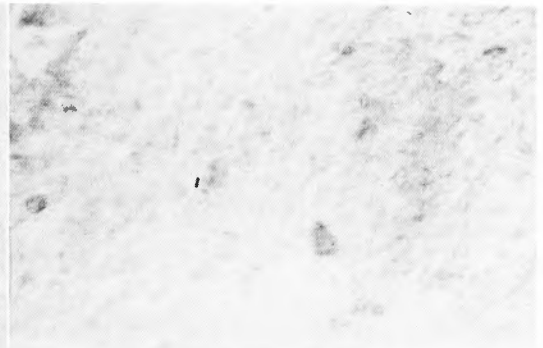


Fig. 14 血流遮断24時間後の大脳皮質
ACP ($\times 400$)

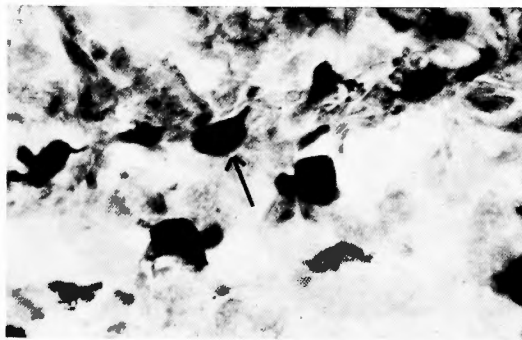


Fig. 15 血流遮断 7 日後, 食喰細胞
ACP ($\times 400$)

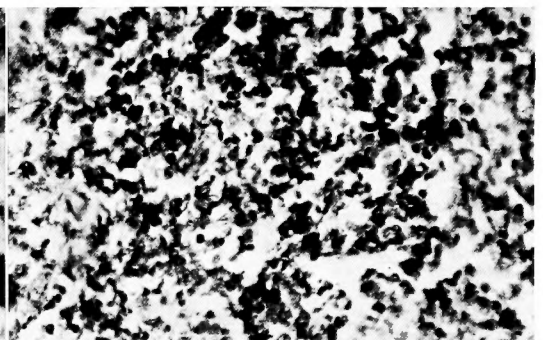


Fig. 16 血流遮断10日後, 食喰細胞の群
(脂肪顆粒細胞を含む)
ACP ($\times 100$)

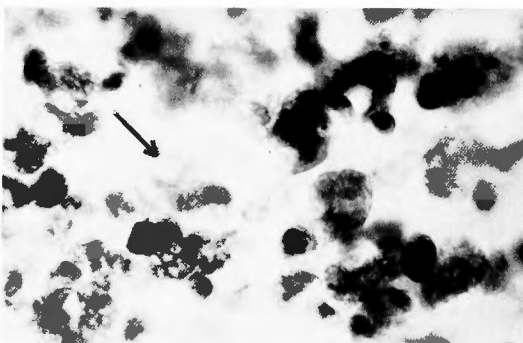


Fig. 17 血流遮断14日後
活性減弱せる大型細胞は脂肪顆粒細胞
ACP ($\times 400$)

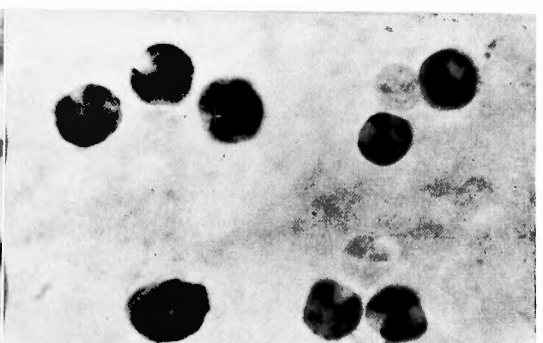


Fig. 18 血流遮断 3 日後
血管内食喰細胞
ACP ($\times 1000$)



Fig. 19 血流遮断6時間後
ALP ($\times 100$)

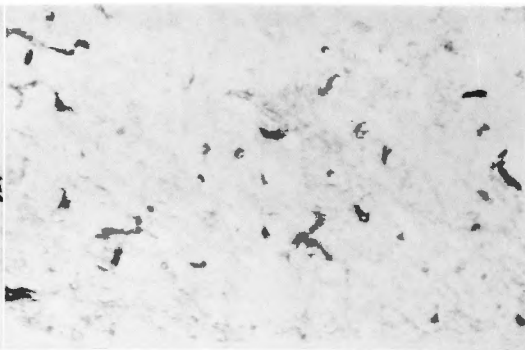


Fig. 20 血流遮断24時間後
ALP ($\times 100$)

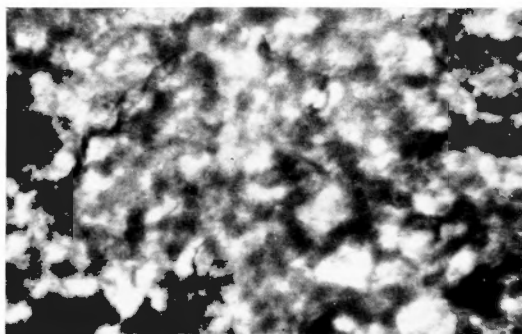


Fig. 21 血流遮断12時間後
DPN-D ($\times 400$)

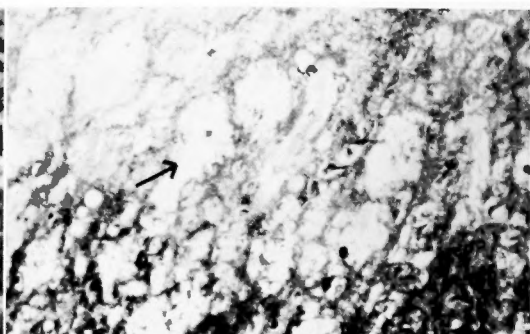


Fig. 22 血流遮断24時間後の出血性梗塞巣
白い部分(活性消失部)は出血巣
DPN-D ($\times 100$)

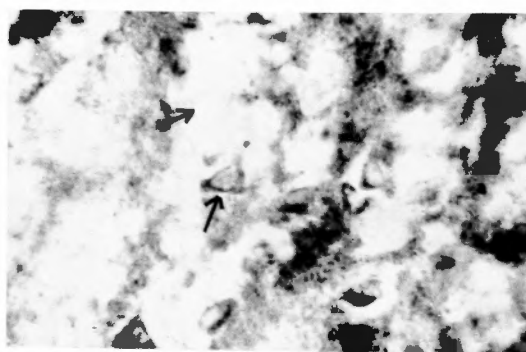


Fig. 23 血流遮断24時間後、出血巣と神経細胞
DPN-D ($\times 400$)



Fig. 24 血流遮断30時間後、貧血性梗塞巣、
神経細胞、神経膠細胞に活性残存
DPN-D ($\times 100$)

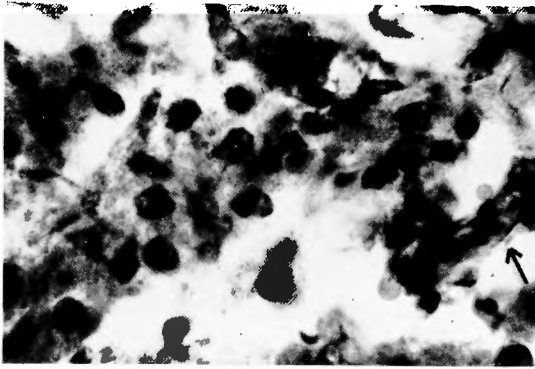


Fig. 25 血流遮断 5 日後、貪食細胞、右端は血管
DPN-D ($\times 400$)

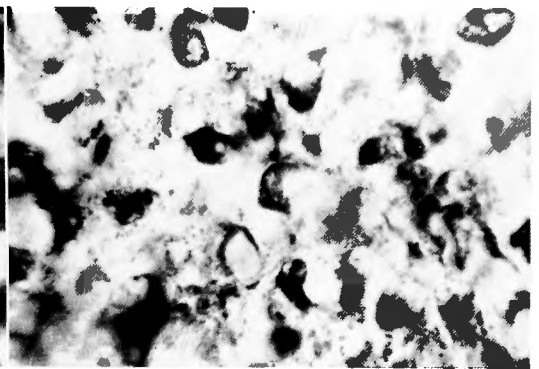


Fig. 26 血流遮断 14 日後、病巣辺縁部の
反応性細胞 DPN-D ($\times 400$)

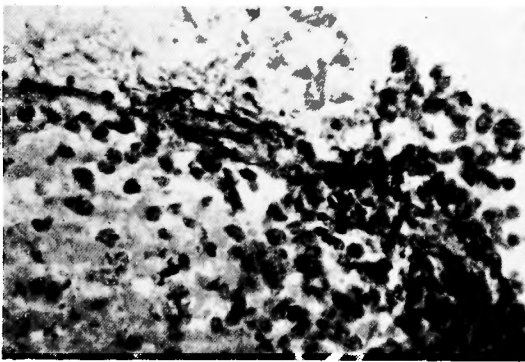


Fig. 27 血流遮断 3 日後
血管壁とその周囲の貪食細胞
TPN-D ($\times 100$)

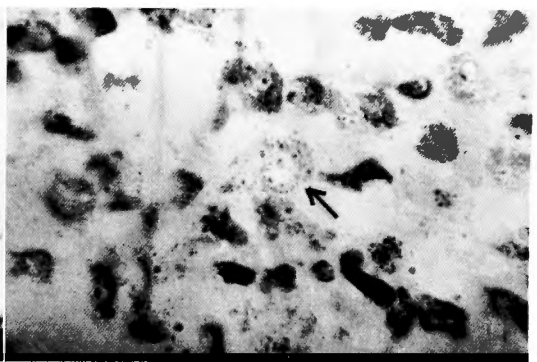


Fig. 28 血流遮断 14 日後
活性減弱せる大型円形細胞は脂肪顆粒細胞
TPN-D ($\times 400$)

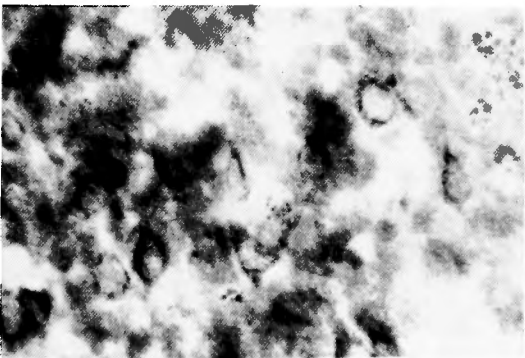


Fig. 29 血流遮断 30 時間後
神経細胞と神経膠細胞
SDH ($\times 400$)

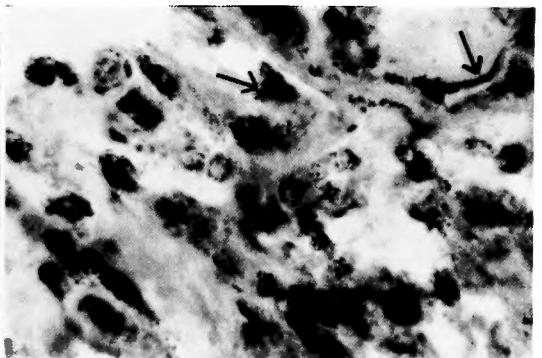


Fig. 30 血流遮断 5 日後
貪食細胞と血管壁
SDH ($\times 400$)

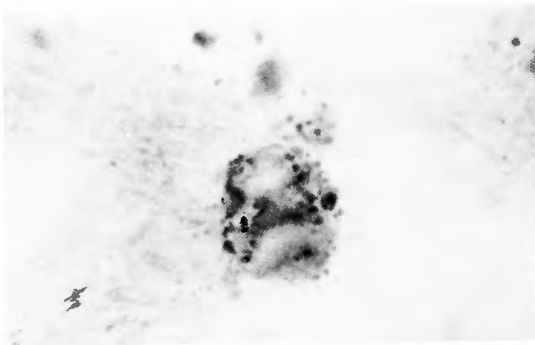


Fig. 31 血流遮断10日後
脂肪顆粒細胞
SDH (×1000)



Fig. 32 Exp. II. C群
小脳プルキンエ細胞
ACP (×400)

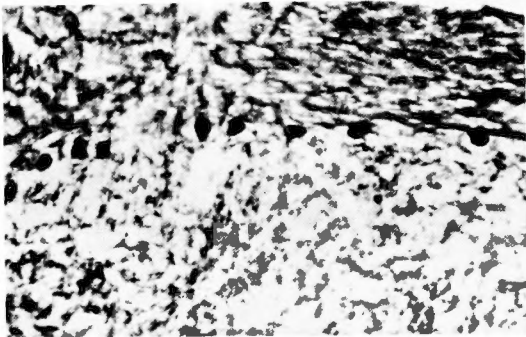


Fig. 33 Exp. II. C群. 小脳皮質
SDH (×100)

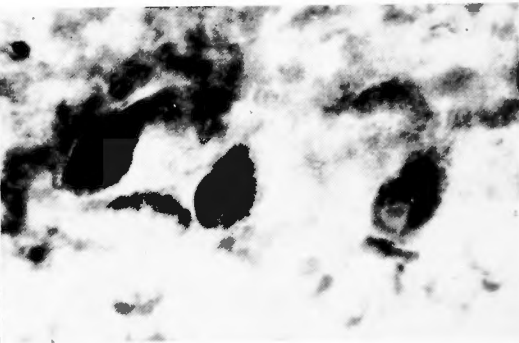


Fig. 34 Exp. II. C群. プルキンエ細胞
SDH (×400)

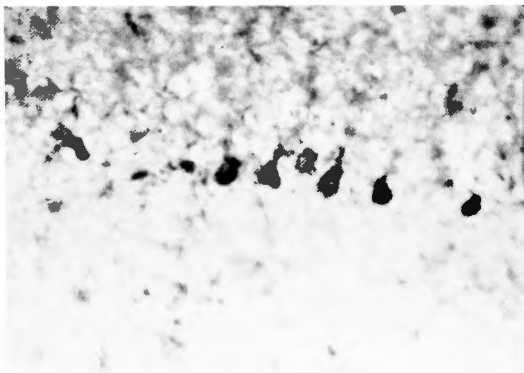


Fig. 35 Exp. III. B群. 小脳皮質
ACP (×100)

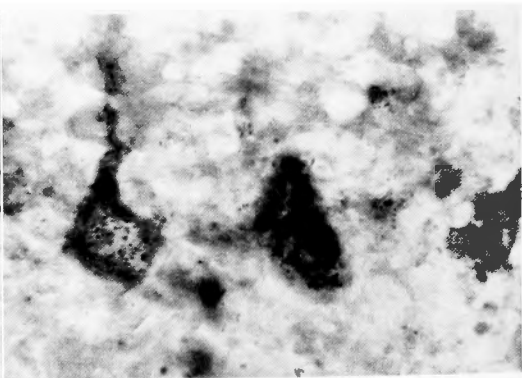


Fig. 36 Exp. III. B群. プルキンエ細胞
ACP (×400)